

Санкт-Петербургский Государственный университет

Афанасьев Михаил Владимирович

**Исследование роли метилтрансферазы Set7/9 в эндометриальных стволовых клетках
человека**

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки бакалавриата
основная образовательная программа 06.03.01 «Биология»

Работа выполнена в отделе
Внутриклеточной сигнализации
Института Цитологии Российской Академии Наук
Руководитель отдела:

академик, д.б.н., профессор Никольский Николай Николаевич

Научный руководитель:

научный сотрудник, к.б.н. Бородкина Александра Васильевна

Научный консультант:

старший преподаватель, к.б.н. Козин Виталий Владиславович

Санкт-Петербург
2019

СОДЕРЖАНИЕ

I. ВВЕДЕНИЕ, ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ.....	6
II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1. Стресс.....	7
2. Апоптоз.....	8
2.1 Ключевые стадии в сигнальных путях апоптоза.....	9
2.2 Внутренний путь.....	9
2.3 Внешний путь.....	9
3. Клеточное старение.....	11
3.1 Арест клеточного цикла.....	11
3.2 Стресс-индуцированная форма старения.....	12
4. Взаимосвязь между апоптозом и клеточным старением.....	13
5. p53 – центральный регулятор клеточного ответа на стресс.....	14
5.1 Регуляция белка p53.....	14
5.2 Ацетилирование и метилирование белка p53.....	15
5.3 Метилтрансферазы p53 и механизм метилирования.....	16
5.4 Мезенхимные стволовые клетки человека.....	18
III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	20
1. Клеточная линия и особенности культивирования клеток	20
2. Моделирование окислительного стресса и условия обработки клеток.....	20
3. Электрофорез и иммуноблотинг.....	20
3.1 Приготовление проб для электрофоретического разделения.....	20
3.2 Электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	21
3.3 Иммуноблотинг со специфическими антителами.....	21
4. Молекулярное клонирование и сборка лентивирусных частиц для генетической модификации клеток.....	22
4.1 Трансформация компетентных бактерий методом теплового шока и накопление плазмиды.....	22
4.2 Выделение ДНК.....	22
4.3 Очистка выделенной ДНК смесью фенол-хлороформ-изобутиловый спирт...23	
4.4 Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	23
4.5 Трансфекция пакующих клеток HEK293T.....	24
5. Трансдукция клеточной линии эЭМК лентивирусными векторами и получение культуры с нокаутом гена <i>setd7</i>	25
5.1 Используемая конструкция и вектор.....	25

5.2 Трансдукция клеточной линии эМСК и последующая селекция.....	26
6. Метод проточной цитофлуориметрии.....	27
6.1 Анализ изменения размера и количества клеток.....	27
6.2 Анализ апоптотических клеток, окрашенных с помощью йодида пропидия и Annexin V/FITC	27
7. Статистическая обработка данных.....	28
IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	29
1. Экспрессия Set7/9 в мезенхимных стволовых клетках линии 2804 в условиях окислительного стресса.....	29
2. Нокаут гена <i>setd7</i> , кодирующего метилтрансферазу Set7/9 в клетках эМСК.....	30
3. Сравнение кривых роста клеток эМСК и мутантных эМСК со сниженным уровнем метилтрансферазы Set7/9.....	31
4. Активация p53/p21 и p16/pRb сигнальных путей клеточного старения в мутантных клетках эМСК со сниженным уровнем метилтрансферазы Set7/9.....	33
5. Характер ответа на активацию апоптоза в клетках эМСК со сниженным уровнем метилтрансферазы Set7/9.....	35
V. ВЫВОДЫ.....	39
VI. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	40

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК	– активные формы кислорода
АТФ	– аденозинтрифосфат
ДНК	– дезоксиуклеиновая кислота
кДНК	– комплементарная ДНК
МСК	– мезенхимные стволовые клетки
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СК	– стволовые клетки
ССК	– соматические стволовые клетки
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
эмСК	– мезенхимные стволовые клетки эндометрия
ЭСК	– эмбриональные стволовые клетки
AnV	– аннексин V
BSA	– бычий сывороточный альбумин
CDKI	– ингибиторы циклин-зависимых киназ
CHK	– чекпоинт киназы
CRISPR	– короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами
DDR	– ответ на повреждение ДНК
DISC	– комплекс, индуцирующий смерть
DMEM	– питательная среда Игла в модификации Дульбеко
DMSO	– диметилсульфоксид
DSB	– двойные разрывы ДНК
FBS	– бычья эмбриональная сыворотка
FITC	– флюоресцеин изотиоцианат
H ₂ O ₂	– перекись водорода
IAPs	– белки, ингибирующие апоптоз
ICAD	– ингибитор каспаз-активируемой ДНКазы
GAPDH	– глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
KTM	– лизинная метилтрансфераза
NES	– фактор экспорта из ядра
PBS	– фосфатно-солевой буфер
PI	– йодистый пропиций
PMSF	– фенилметилсульфонилфторид
Rb	– белок ретинобластомы
gRNA	– гидовая рибонуклеиновая кислота

SA- β -Gal – ассоциированная со старением β -галактозидаза

SDS – додецилсульфат натрия

TAE – трис-ацетатный буфер с этилендиаминтетрауксусной кислотой

TTBS – фосфатно-солевой буфер с Tween 20

ВВЕДЕНИЕ

Белок p53 является центральным регулятором клеточного ответа на стресс, через активацию клеточного старения или процесса программируемой клеточной смерти – апоптоза. Регуляция активности белка p53 осуществляется на различных уровнях, в том числе посредством конформационных изменений в ходе посттрансляционных модификаций. Относительно недавно, было отмечено, что одним из необходимых регуляторов активности белка p53 является метилтрансфераза Set7/9. Большая часть исследований данной функции метилтрансферазы было сделано на культурах раковых клеток в экспериментах по изучению онкогенной активности при нарушении метилирования белка p53. Лишь небольшая часть работ посвящена вовлечённости Set7/9 в процессы, связанные с реакцией клеток на стресс. Основные данные, свидетельствующие о критической роли Set7/9 в активации клеточного ответа на стресс были также получены на культурах раковых клеток. В противовес данным результатам проведён ряд исследований на культурах здоровых клеток человека и на мышах *in vivo*, утверждающих об отсутствии вклада Set7/9 в регуляцию белка p53. В том числе отсутствуют данные о роли Set7/9 в стволовых клетках человека, участвующих в регенерации тканей.

Таким образом, целью исследования является установление роли метилтрансферазы Set7/9 в реакции эндометриальных стволовых клеток человека на окислительный стресс.

Для этого было предложено решить следующие задачи:

1. Получить линию эндометриальных мезенхимальных стволовых клеток человека с нокаутом гена *setd7*, кодирующего метилтрансферазу Set7/9.
2. Оценить уровень экспрессии гена метилтрансферазы Set7/9 по мере развития H₂O₂-индуцированного стресса.
3. Оценить влияние метилтрансферазы Set7/9 на активацию старения через сигнальный путь p53/p21/pRb в условиях сублетальных доз H₂O₂.
4. Оценить влияния метилтрансферазы Set7/9 на процесс активации апоптоза в условиях летальной дозы H₂O₂.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

СТРЕСС

Под *стрессом* в физиологии понимается совокупность неспецифических адаптационных системных реакций организма в ответ на воздействие факторов меняющихся условий окружающей среды - стрессоров. Стресс носит адаптивный характер к условиям окружающей среды. Данное понятие успешно применяется и к клетке, так как в тканях *in vivo* так и *in vitro* на клетку оказывается большое воздействие внешних и внутренних стимулов, некоторые из которых могут вызывать стресс. Стресс является реакцией клетки на изменения внеклеточного окружения, повреждающее или изменяющее функции макромолекул.

В зависимости от силы и продолжительности воздействия стрессора, клетка способна изменять свой гомеостаз как для возвращения в прежнее состояние, так и адаптируясь к новому состоянию в изменившихся условиях. Таким образом, различные стрессоры и различная сила стрессового воздействия вызывает различные клеточные ответы:

- 1) репарацию;
- 2) арест клеточного цикла и старение;
- 3) аутофагию;
- 4) клеточную смерть (апоптоз).

В зависимости от типа стрессора можно выделить тепловой стресс, токсический, механический, генотоксический, оксидативный (окислительный). О *генотоксическом стрессе* говорят при непосредственном воздействии на ДНК. В данном случае генотоксические агенты приводят к повреждениям в процессах транскрипции и репарации ДНК. Под *оксидативным стрессом* понимают состояние клетки, возникающее при действии на неё активных форм кислорода (АФК), поступивших как экзогенно, так и при избыточной продукции эндогенных форм АФК. В основном это супер-оксид радикал ($O_2\bullet$), гидроксил-радикал ($OH\bullet$) и перекись водорода (H_2O_2). Кроме повреждения ДНК окислительный стресс широко вовлечён в физиологические процессы, в том числе пролиферацию и адгезию клеток, а также патологические процессы, такие как прогрессия рассеянного склероза, женское бесплодие, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, атеросклероз, аутизм. Несмотря на это, АФК в норме секретируются в организме постоянно, а особенно активно при иммунном ответе. Так как состояние оксидативного стресса обусловлено более глобальными повреждениями в клетке, нежели при

генотоксическом, его выделяют отдельно. Однако, молекулярные механизмы ответа на повреждение ДНК при генотоксическом и оксидативном стрессе во многом схожи. Двумя основными типами ответа на стресс являются арест клеточного цикла, приводящий к клеточному старению и контролируемая клеточная смерть - апоптоз.

АПОПТОЗ

Термин *апоптоз* был предложен Керром и коллегами в 1972 году для обозначения тогда ещё малоизученного механизма контролируемой клеточной смерти (Kerr et al. 1972). Апоптоз характерен для многоклеточных организмов как способ элиминирования повреждённых клеток, представляющих угрозу для организма. В том числе апоптозом гибнет большинство опухолевых клеток. Биохимические события в ходе апоптоза приводят к изменению морфологии клетки и её смерти. К этим изменениям относятся образование вздутий (blebbing), фрагментация ядра, конденсация и фрагментация хроматина и разрушением РНК, потеря контактов с соседними клетками, экспонирование остатков фосфатидилсерина на внешней стороне клеточной мембраны (сигнал для фагоцитирования макрофагами) (Bowen, Bowen, 1990; Kerr, Harmon, 1991; Tomei, Core, 1994; Razvi, Welsh, 1995). Апоптоз является однонаправленным процессом, поэтому имеет несколько уровней регуляции. Основными сигналами к апоптозу являются не только внутренние повреждения ДНК, но в также и повреждения цитоскелета, гипоксия, повышение концентрации кальция, вирусная инфекция, отсутствие тканевых морфогенов и ростовых факторов (Elmore 2007).

Сигнальные пути апоптоза можно разделить на внутренний путь при сигнале к апоптозу изнутри клетки (в случае стресса) и внешний путь при сигнале от других клеток, чаще иммунных (Рис. 1). Оба пути индуцируют клеточную смерть через активацию высококонсервативных белков - каспаз (цистеин-зависимых аспартат-специфичных протеаз), представленных в большинстве клеток в виде прокаспаз. Каспазы делятся на два типа: инициаторные (каспазы 2, 8, 9, 10, 12, 15) и эффекторные (каспазы 3, 6, 7, 14). Активация инициаторных каспаз требует связывания со специфичными олигомерными активаторными белками с последующей мультимеризацией. Эффекторные каспазы активируются инициаторными каспазами посредством протеолитического расщепления. Эффекторные каспазы в свою очередь приводят к протеолитической деградации различных внутриклеточных белков, что приводит к характерным для программы клеточной смерти событиям. Например, каспаза 3 расщепляет ингибитор каспаз-активируемой ДНКазы (ICAD), позволяя ICAD мигрировать в ядро и фрагментировать ДНК (Ashkenazi 2008).

Ключевые стадии в сигнальных путях апоптоза

Внутренний путь апоптоза

Активация внутреннего пути апоптоза тонко регулируется семейством белков Bcl-2. Белки Bid, Bad, Bim, Bmf, Puma и Noxa содержат Bcl-2-гомологичный домен 3 (BH3-домен) и обладают проапоптотической активностью. Две другие группы белков имеют несколько BH-доменов. Первая группа включает белки Bax, Bak и Bok, являющиеся проапоптотическими; вторая – Bcl-2, Bcl-XL и Mcl-1 – антиапоптотические. BH3-белки способствуют апоптозу через регуляцию взаимодействия этих двух групп белков.

В ходе клеточного стресса активируется белок p53. P53 инициирует внутренний путь через up-регуляцию Puma и Noxa, которые в свою очередь активируют Bax и Bak. В то же время киназа Akt, которая работает в ответ на сигнал от ростовых факторов, ингибирует внутренний путь апоптоза, фосфорилируя Bad. Белки Bax и Bak образуют поры во внешней мембране митохондрий, приводя к выходу цитохрома c, который связывается с адаптором Apaf-1 в цитозоле для привлечения инициаторной прокаспазы 9 и образования сигнального комплекса – апоптосомы. Активированная каспаза 9 разрезает и активирует эффекторные каспазы для запуска апоптоза. Митохондриальные белки Smac/DIABLO, локализуясь в цитоплазме, усиливают апоптоз, связывая антиапоптотические белки, называемые белками-ингибиторами апоптоза (IAPs). Тем самым Smac/DIABLO ингибируют активность сразу нескольких каспаз (Chipuk et al. 2010).

Внешний путь апоптоза

Апоптоз в клетке может быть индуцирован цитотоксическими факторами или проапоптотическими лигандами иммунных клеток через вовлечение внешнего пути. Данные лиганды, принадлежащие к суперсемейству цитокинов TNF (опухоле-некротические факторы), связываются с проапоптотическим рецептором «смерти» на поверхности клетки-мишени, тем самым запуская внешний путь апоптоза. Один из таких факторов – апоптотический лиганд 2/TNF-подобный апоптоз-индуцирующий лиганд (Apo2L/TRAIL) – передаёт сигнал к апоптозу через два проапоптотических рецептора: DR4 и/или DR5. Второй белок – Fas/Apo1/CD95 лиганд (FasL) – передаёт сигнал через Fas/Apo1/CD95 рецептор. Связывание Apo2L/TRAIL и FasL с их проапоптотическими рецепторами индуцирует кластеризацию рецептора и рекрутирует адаптерный белок Fas-ассоциированный домен смерти (FADD) и инициаторные каспазы 8 и 10 в виде прокаспаз.

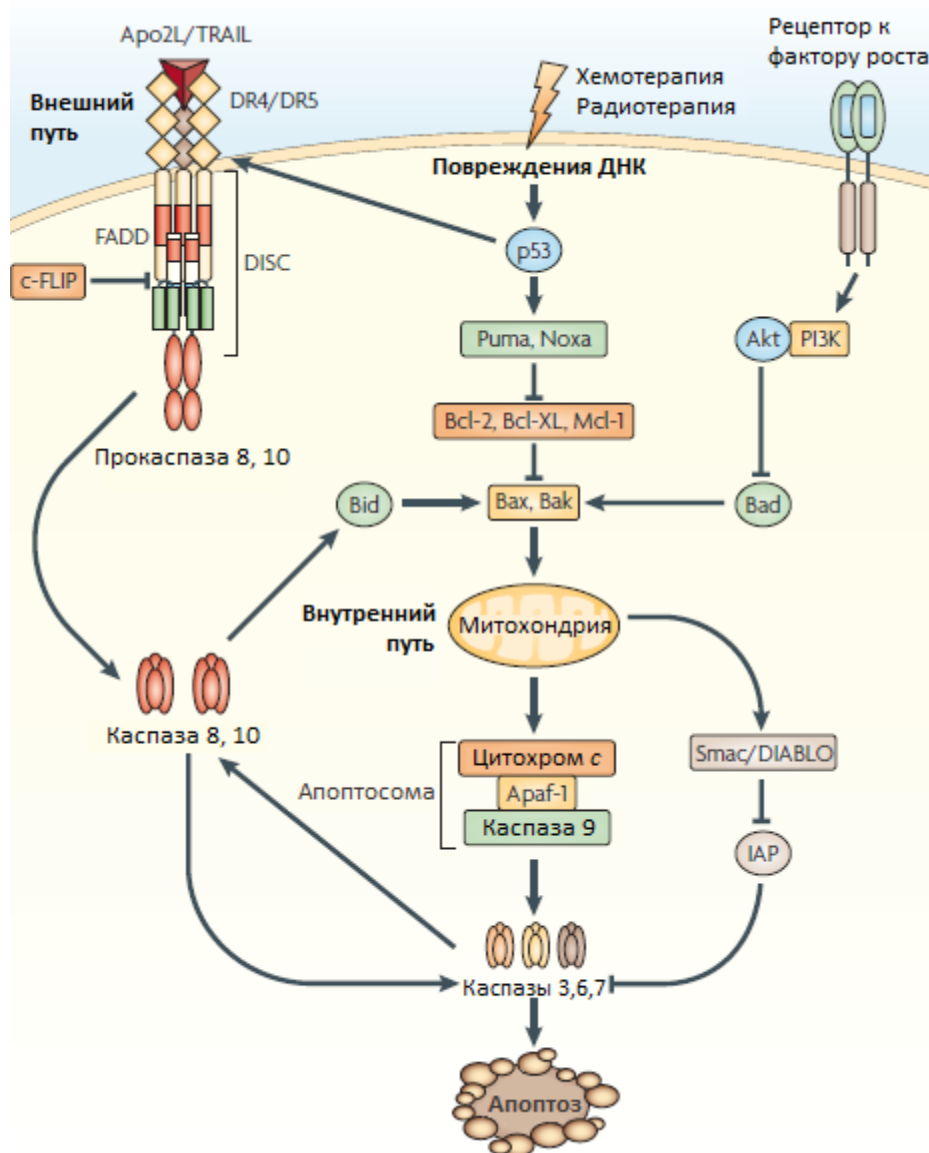


Рис. 1. Ключевые стадии сигнального пути апоптоза (по Ashkenazi 2008).

Данные события приводят к формированию сигнального комплекса, индуцирующего смерть (death-inducing signaling complex, DISC), активирующего автокаталитический процессинг прокаспаз 8 и 10 в каспазы. Каспазы в свою очередь выходят в цитозоль и активируют нижележащие эффекторные каспазы. Формирование комплекса DISC может негативно регулироваться несколькими ингибиторными механизмами, включая белок c-FLIP, который ассоциируется с DISC через взаимодействие с FADD для блокировки инициаторных каспаз. Позитивная регуляция формирования DISC осуществляется посредством О-гликозилирования внеклеточных доменов проапоптотических рецепторов DR4 и DR5.

Несмотря на то, что внутренний и внешний путь могут функционировать независимо, они часто взаимодействуют. P53 как правило стимулирует внутренний путь,

но также up-регулирует некоторые проапоптотические рецепторы, например, DR5 и запускает внешний путь. В свою очередь активированная во внешнем пути каспаза 8 участвует в процессинге и активации белка Bid, стимулирующего Bax и Bak с привлечением внутреннего пути. Эффекторные каспазы способны в последствии процессировать прокаспазу 8 (Ashkenazi 2008).

КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ

Феномен клеточного старения впервые был описан Хейфликом в 1961 году как лимит клеточных делений в культуре, а в 1965 было выдвинуто предположение отуморесупрессорной роли данного процесса и его вкладе в старение организмов.(Hayflick&Moorhead 1961; Hayflick 1965). Клеточным старение – это Потеря клеткой профилеративной активности, которое обусловлено укорочением теломер или повреждением ДНК. Соответственно, выделяют репликативную и стресс-индуцированную формы старения. В ходе старения клетка приобретает характерные молекулярные маркеры и претерпевает цитоплазматические изменения, такие как изменение морфологии, снижение активности 26S субъединицы протеасом, повышения уровня эндогенных АФК, изменения в липидах и гликопротеинах плазматической мембраны, снижение потенциала мембран митохондрий и увеличение массы митохондрий, снижение продукции АТФ, повышение уровня β -галактозидазы (Borodkina et al. 2018).

Арест клеточного цикла

Отличительной чертой стареющих клеток является невозможность завершить клеточный цикл. Арест клеточного цикла может происходить как в G1, так и в G2-M фазах клеточного цикла. Это зависит как от типа клетки, так и от факторов, вовлечённых в процесс старения. В любом случае стареющие клетки остаются метаболически активными. Основными белками, экспрессирующимися в стареющих клетках являются ингибиторы циклин зависимых киназ (CDKI) p21 и p16. Данные ингибиторы являются участниками двух сигнальных путей: сигнального пути p53 и сигнального пути белка ретинобластомы (pRb) (**Рис. 2**). Оба пути могут участвовать в активации и поддержании ареста клеточного цикла. Достоверно известно, что p21 индуцируется напрямую белком p53, в то время как путь белка p16 всё ещё плохо изучен. p21 и p16 поддерживают активное гиперфосфорилированное состояние белка pRb. PRb в свою очередь инактивирует

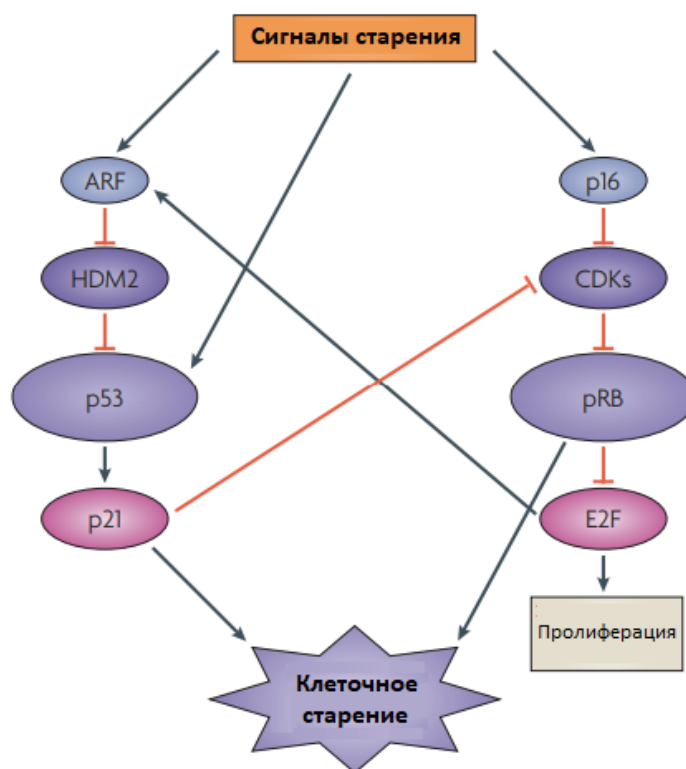


Рис. 2. Сигнальные пути p53/p21 и p16-pRb, вовлечённые в процесс клеточного старения (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

транскрипционный фактор E2F1 и участвует в реорганизации хроматина с образованием ассоциированных со старением фокусов гетерохроматина (SAHF). Данные изменения приводят к репрессии генов, кодирующих белки, вовлечённые и стимулирующие прогрессию клеточного цикла, такие как вовлечённые в S-фазу гистоны, протоонкоген c-FOS, циклин A, циклин B и ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA).

Стресс-индуцированная форма старения

Инициация клеточного старения в клетке начинается с возникновения нерепарируемых участков в повреждённой ДНК. Наиболее распространёнными повреждениями в ДНК являются одно- и двуцепочечные разрывы, ковалентные сшивки между азотистыми основаниями, ковалентные сшивки между ДНК и белками. Двухцепочечные разрывы представляют наибольшую угрозу, так как могут приводить к хромосомным абберациям. Возникновение двухцепочечных разрывов инициирует ответ на повреждение ДНК (DNA damage response, DDR) (**Рис. 3**).

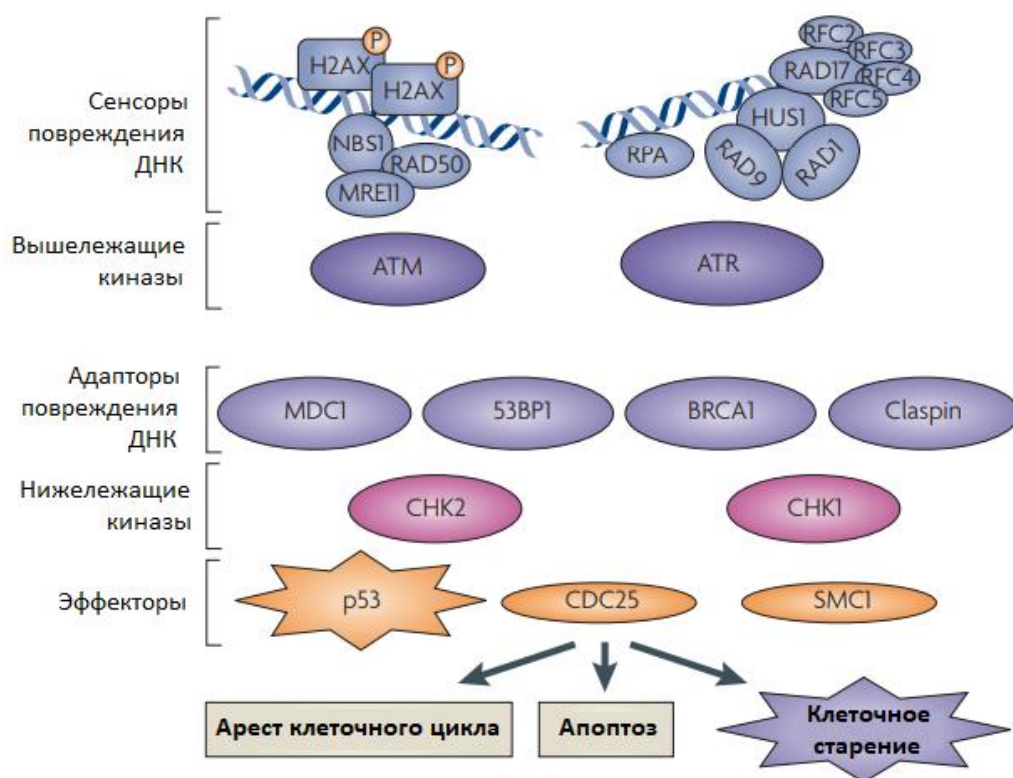


Рис. 3. Участники ответа на повреждение ДНК (DDR) (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

После образования DDR начинается с активации сенсорной киназы ATM, распознающей повреждения в ДНК и фосфорилирующей разновидность гистонов H2AX, белок p53 и чекпоинт киназу CHK2. Фосфорилирование H2AX в местах двуцепочечных разрывов ДНК приводит к образованию фокусов γ -H2AX, куда рекрутируются белки, участвующие в репарации ДНК. К ним относятся MRE11/RAD50/NBS1 (MRN комплекс), белок репликации A (RPA) и фактор репликации C (RFC)-подобный комплекс, в состав которого входит чекпоинт белок клеточного цикла RAD17. Данные белки рекрутируют комплекс 911 (RAD9/HUS1/RAD1). Далее к местам разрывов рекрутируются адапторные белки, включая MDC1, 53BP1, BRCA1 и класпин, необходимых для работы нижележащих киназ, таких как чекпоинткиназа 1 (CHK1) и CHK2 (Campisi 2001; Campisi & d'Adda di Fagagna 2007).

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ АПОПТОЗОМ И КЛЕТОЧНЫМ СТАРЕНИЕМ

Многие, но не все, типы клеток способны проявлять устойчивость к апоптозу в состоянии старения. Например, стареющие фибробласты устойчивы к церамид-индуцированному апоптозу, в отличие от эпителиальных клеток. Стареющие человеческие фибробласты также устойчивы к апоптозу, индуцированному отсутствием

ростовых факторов или оксидативным стрессом, но не устойчивы к апоптозу, связанному с вовлечением Fas-рецептора. Устойчивость к апоптозу частично объясняет, почему клетки стабильны в культуре (Chen et al. 2000; Terper et al. 2000).

До сих пор точно неизвестно, что является переключателем путей старения и апоптоза. Первое различие – тип клетки. Поврежденные фибробласты или эпителиальные клетки скорее всего пойдут по пути старения, в то время как лимфоциты выберут апоптоз. Природа и сила стрессора также не менее важны. Для большинства типов клеток характерны оба варианта ответа на стресс. Более того, манипуляции с про- и антиапоптотическими факторами могут заставлять клетки, отвечающие на стресс апоптозом, стареть, и наоборот заставлять клетки, отвечающие на стресс старением, уходить в апоптоз. Таким образом, регуляторные системы апоптоза и старения взаимосвязаны. Вероятно, эта взаимосвязь осуществляется через общий регулятор – белок p53. Механизм устойчивости стареющих клеток к апоптозу ещё плохо изучен. В некоторых клетках устойчивость может возникать благодаря изменению экспрессии белков-ингибиторов, белков-активаторов и белков-участников апоптоза. В других белок p53 способен к избирательной трансактивации генов, участвующих в аресте пролиферации в большей степени, чем генов, способствующих апоптозу (Campisi & d'Addadi Fagagna 2007).

P53 – ЦЕНТРАЛЬНЫЙ РЕГУЛЯТОР КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА НА СТРЕСС

p53 является транскрипционным фактором, оказывающим значительное влияние на клетку через активацию или репрессию генов-мишеней. Можно заметить, что белок p53 играет важную роль в аресте клеточного цикла и обоих типах ответа клеток на стресс. Вероятно, именно на уровне этого белка принимается решение о судьбе клетки.

Регуляция белка p53

Регуляция ядерной локализации белка

Функция p53 зависит от ядерной локализации. Регулирование и импорта и экспорта p53 тесно взаимосвязаны. Импорт в ядро зависит от взаимодействия белка с сетью микротрубочек и динеином. Белок распознаётся по факторам ядерной локализации (NLS), располагающимся на С-терминальном конце белка. Также на С-терминальном хвосте p53 содержит фактор экспорта из ядра (NES), однако экспорт регулируется белком

MDM-2 (mouse double minute 2 homolog, HDM-2 у человека), осуществляющем полиубиквитинирование белка для деградации его в протеасомах (Ryan et al. 2001).

Регуляция стабильности и активности белка p53

Белок p53 неактивен в клетках в норме. Концентрация и активность p53 регулируется в основном на посттрансляционном уровне. Время полужизни белка p53 в норме около 6-20 минут, в то время как в состоянии стресса оно может достигать часов. Посттрансляционные модификации селективно активируются в зависимости от различных стрессовых сигналов. P53 может быть модифицирован фосфорилированием, ацетилизацией, метилированием, гликозилированием, убиквитинированием (Ak & Levine 2010). В отсутствие стресса p53 полиубиквитинируется E3 убиквитин-лигазой MDM-2, которая ускоряет деградацию p53 в протеасомах. С другой стороны, транскрипция MDM-2 регулируется белком p53, таким образом создаётся ауторегулируемая негативная петля (Ryan et al. 2001). MDM-2 функционирует как гетеродимер вместе с белком MDM-4, образуя дополнительную петлю между MDM-2 и MDM-4, так как MDM-2 убиквитинирует MDM-4. Комплексы MDM-2/MDM-4 и MDM-2/p53 регулируются протеин-киназами CHK1, CHK2 и ATM (Ak & Levine 2010). При повреждениях в ДНК активируется сенсорная ATM киназа (ataxia-telangiectasia mutated gene), ингибирующая MDM-2 и активирующая p53. Члены суперсемейства кальций-кальмодулиновыхкиназ, CHK1/CHK2 киназы, фосфорилируют MDM-2, который диссоциирует от MDM-4, приводя к повышению внутриклеточного уровня белка p53. Убиквитиновые протеазы HAUSP (herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease, также ubiquitin-specific protease 7; USP7) и USP42 снимают убиквитин с p53 и стабилизируют его. Таким образом, стрессовые сигналы приводят к повышению уровня p53, что вызывает селективную транскрипцию генов-мишеней, арест клеточного цикла, апоптоз или потерю пролиферативной способности (старение). Различные стрессовые сигналы приводят к различным посттрансляционным модификациям белка p53 и транскрипции различных групп генов.

Ацетилирование и метилирование белка p53

Известно, что ацетилирование играет важную роль в регуляции и функционировании белка p53 *in vivo* и существует механизм активации p53, зависимый от ацетилирования. Так, ацетилирование p53 по С-терминальному концу ацетилтрансферазами p300/CBP и PCAF приводит к изменению конформации белка так, что его ДНК-связывающий домен становится открытым (Reed & Quelle 2014).

Предполагается наличие связи между метилированием и ацетилизацией p53. В исследовании Ivanov et al. 2007 было показано, что в клетках остеосаркомы человека метилирование необходимо для последующего ацетилирования, а также показана вовлечённость метилтрансферазы Set7/9 в арест клеточного цикла на стадии G2-M (Ivanov et al. 2007). В исследовании Kurash et al. было показано, что нарушение метилирования p53 в клетках костного мозга мышей *in vivo* препятствует ацетилированию белка p53, необходимого для изменения его конформации белка и соответственно приводит к нарушению его активации в ответ на стресс. Известно, что метилирование p53 осуществляется по С-терминальному концу полипептидной цепи в месте расположения регуляторного домена, мутации которого часто обнаруживаются в раковых клетках (Рис. 4).

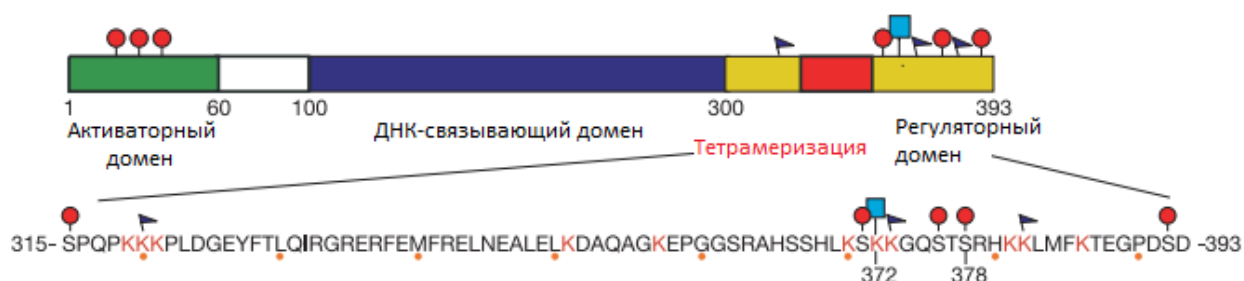


Рис. 4. Схема доменной структуры белка p53 и посттрансляционных модификаций (Reed & Quelle 2014). Кружками, флажками и прямоугольником отмечены сайты фосфорилирования, ацетилирования и метилирования соответственно.

Метилирование может производиться по различным сайтам. Метилирование p53 человека по остатку лизина 372 (K372) стабилизирует и активирует p53, в то время как метилирование по K370 репрессирует его активность. Для мышей показано метилирование по K369 и K367 с соответствующими эффектами (Kurash et al. 2008).

Метилтрансферазы p53 и механизм метилирования

Было обнаружено, что две гистоновые метилтрансферазы Set7/9 и Smyd2 участвуют в метилировании p53 в раковых клетках (Chuikov et al. 2004; Huang et al. 2006). Set7/9 ((Su(var)-3-9, Enhancer-of-Zeste, Trithorax) domain containing protein 7/9) относится к семейству нехроматиновых лизиновых метилтрансфераз (KMT). Показано, что Set7/9 способна монометилировать гистоны H3 по четвертому лизину (H3K4), а также ряд негистоновых белков (Pradhan et al. 2009). В исследовании Chuikov et al. 2004 года было показано, что Set7/9 метилирует p53, а оверэкспрессия Set7/9 при генотоксическом стрессе приводит к высокому уровню белка p21. Также было показано, что метилированная форма p53 находится в ядре (Chuikov et al. 2004). Исследования Ivanov et al. и Kurash et al. о

необходимости предварительного метилирования для последующего ацетилирования и активации p53 было проведено именно на основе данных исследования Chuikov et al. 2004 с использованием раковых культур и линии мышей с нокдауном и нокаутом гена, кодирующего метилтрансферазу Set7/9, соответственно. Интересно, что для Set7/9 была показана способность регулировать активность фактора E2F1, связанного с активностью белка p53, а также регулировать p53 через MDM-2. Данное исследование было проведено в том числе на раковых клетках (Lezina et al. 2014; Lezina et al. 2015).

Однако в 2011 году двумя научными группами независимо друг от друга были получены результаты об отсутствии роли Set7/9 в процессах апоптоза и клеточного старения. Группой Campaner et al. 2011 были получены жизнеспособные мыши нокаутные по Set7/9, у которых не было отмечено повышенной предрасположенности к опухолеобразованию. У данных мышей отмечалось наличие Set7/9 в тканях мозга, что авторы связывают с возможным наличием альтернативного промотора или сплайсинга. Этой же группой была проведена серия экспериментов, показывающих отсутствие связи между нокаутом Set7/9 и такими явлениями, как активация DDR, арест клеточного цикла, а также ацетилирование p53 при сублетальных дозах стрессора. Данные были получены с использованием эмбриональных мышинных фибробластов (MEF) (Campaner et al. 2011). Другая исследовательская группа также получила жизнеспособных мышей и культуру клеток линии MEFc нокаутом по Set7/9. На клеточной культуре также не было выявлено связи Set7/9 с активацией DDR, арестом клеточного цикла, старением и апоптозом. Причём, не было выявлено различий в монометилировании гистона H3 по четвёртому лизину в сравнении с диким типом (Lehnertz et al. 2011). Такие противоречивые данные могут говорить о различиях в регуляции белка p53 в разных типах клеток или существовании компенсаторных механизмов, участвующих в метилировании и ацетилировании с последующей активацией p53.

Стоит отметить, что большая часть исследований о вовлечённости Set7/9 в процесс регуляции p53 и активацию апоптоза и старения была проведена *in vitro* на раковых клетках и *in vivo* на мышах. Таким образом, роль данной метилтрансферазы в здоровых клетках человека остаётся всё ещё неизвестной.

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

В данной работе предлагается использовать эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека (эМСК) в качестве модели здоровых клеток организма человека.

Эндометрий человека претерпевает около 400 циклов обновления в течение репродуктивной жизни женщины (Jabbour et al., 2006; Gargett, 2007). Гистологически человеческий эндометрий подразделяют на два слоя: базальный и функциональный (Padykula, 1991; Patel et al., 2008; Umezawa, Makino, 2008). В 2004 году были опубликованы данные, свидетельствующие о наличии в базальном слое эндометрия человека клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры стволовых клеток CD117 и CD34 (Cho et al., 2004). Была обнаружена способность данных клеток дифференцироваться *in vitro* в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях, а также экспрессия ими специфических поверхностных маркеров (CD73, CD90, CD105), что позволило отнести эти клетки к мезенхимальным (Cervelló et al., 2013). В 2007-2008 годах из десквамированного эндометрия были получены СК, сохранявшие стабильный кариотип при длительном культивировании (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008). Было подтверждено существование эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (эМСК). Следует отметить особенности данных СК, дающих основания для разностороннего изучения этого нового типа клеток: (1) неинвазивный и легкодоступный способ получения, (2) высокий индекс пролиферации, (3) сохранение стабильного кариотипа при длительном культивировании, (4) успешное применение в терапии экспериментальных животных и (5) перспективные результаты клинического применения на людях.

В МСК, несмотря на их стволовую природу, не выявлена экспрессия теломеразы (Zimmermann et al., 2003). Таким образом, МСК характеризуются лимитом Хейфлика, а соответственно могут подвергаться репликативному старению (Banfi et al., 2002; Stenderup et al., 2003). Было обнаружено, что при длительном культивировании МСК происходит укорочение теломер (Banfi et al., 2002; Baxter et al., 2004), потеря способности к дифференцировке (Digirolamo et al., 1999), а также повышение β -галактозидазной активности (Stenderup et al., 2003). В дополнение к этому было показано, что МСК человека в условиях сублетального стресса могут подвергаться индуцированному преждевременному старению после повреждения ДНК γ -излучением, в результате теплового шока или в условиях оксидативного стресса (Wang, Jang, 2009; Brandl et al., 2011b; Kim et al., 2011; Alekseenko et al., 2012; Cmielova et al., 2012; Ko et al., 2012; Larsen et al., 2012; Burova et al., 2013). Важно отметить, что потеря пролиферативной активности

вследствие старения МСК ведёт к утрате способности регенерировать эндометрий, что подчеркивает необходимость изучения механизмов, лежащих в основе этого явления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Клеточная линия и особенности культивирования клеток

В работе использовалась первичная культура эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (эМСК) линии 2804, полученная сотрудниками Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). эМСК были выделены из десквамированного эндометрия менструальной крови от здоровых доноров (Земелько и др., 2011). Клетки культивировались в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1% пенициллина-стрептомицина и 1% глутамакса (Gibco, США), и инкубировались при 37°C в атмосфере 5% CO₂ во флаконах площадью 25 см² или 75 см². Для всех экспериментов клетки рассевали на культуральные чашки диаметром 35 мм (Corning, США) в плотности 120 000 клеток/см². Для всех опытов использовали культуры 12-14 пассажей через сутки после посева.

2. Моделирование окислительного стресса и условия обработки клеток

Моделирование окислительного стресса производилось с помощью добавления в бессывороточную ростовую среду 2 mM раствора перекиси водорода (H₂O₂) (конечная концентрация 200 мкМ), который был приготовлен из 30%-ого раствора H₂O₂ (Sigma, США) непосредственно перед использованием. Обработку клеток данной средой проводили в течение 1 часа при 37°C в атмосфере 5% CO₂, после чего клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и далее культивировали в свежей ростовой среде, содержащей сыворотку.

3. Электрофорез и иммуноблоттинг

3.1. Приготовление проб для электрофоретического разделения

Прикрепленные клетки дважды промывали холодным PBS и лизировали в буфере, содержащем 50 мМТрис-HCl, 150 мМNaCl, 1 мМ ЭДТА, 1% тритона X-100, 0,1% SDS, дезоксихолат натрия, 1 мМ Na₃VO₄, 0,2мМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз (1:100, Sigma, США), в течение 5 мин на льду. После лизиса клетки соскребали с чашек и центрифугировали в пробирках на 2 мл в течение 20 мин при 4°C, 13200 g. К супернатанту добавляли 1/4 часть буфера для электрофоретических проб (40 мМ Трис pH 6,8, 10% SDS, 20% 2-меркаптоэтанола и 40% глицерина), после чего инкубировали пробы в течение 5 мин при 99°C. Готовые пробы использовались сразу или хранились при температуре

-20°C. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976), используя овальбумин для построения калибровочной кривой.

3.2 Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белков проводили методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Процентное содержание акриламида в разделяющем геле варьировали (от 10 до 12 %) в зависимости от молекулярного веса белков интереса. Разделение белков проводили в блоках геля 90×60×1 мм при силе тока 40 мА на пластину в течение 2-3 ч, используя метод Лэммли (Laemmli, 1970). В форезных камерах использовали Tris-глициновый электродный буфер (pH 8,3), содержащий 25 мМ Tris-HCl, 250 мМ глицина и 0,1 % SDS.

3.3 Иммуноблотинг со специфическими антителами

Белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) методом «мокрого» переноса на трансблоте фирмы Bio-Rad (США) с использованием буфера, содержащего 48 мМ Tris-HCl, 39 мМ глицина, 0,1 % SDS и 5-20 % метанола в зависимости от молекулярного веса исследуемых белков. Для визуализации белковых полос на мембране использовали Ponceau S (Sigma, США). Иммуноблотинг проводили в соответствии с методикой ECL Western Blotting protocols (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Мембрану промывали 3 раза по 5 мин в буфере TBS-Tween-20 (TTBS, 20 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 150 мМ NaCl, 0,1% Tween-20) при покачивании, после чего инкубировали в 5 %-ном растворе сухого обезжиренного молока (Sigma, США), приготовленном на TTBS, в течение 1 часа при комнатной температуре. По окончании инкубации мембрану снова промывали в TTBS 3 раза по 5 мин и переносили в раствор первичных антител, приготовленный либо на 5 %-ном молоке в TTBS, либо на 5%-ном растворе BSA в TTBS и содержащий NaN₃ (1:1000), и инкубировали в течение ночи на +4°C при покачивании. Для специфического выявления белков использовались следующие первичные антитела: (1) моноклональные кроличьи антитела против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10) (#2118, Cell Signaling, США); (2) моноклональные кроличьи антитела против p21^{Waf1/Cip1} (clone 12D1) (#2947, Cell Signaling, США); (3) моноклональные мышинные антитела против p16 (clone D25) (#sc-81613, Santa Cruz, США); (4) поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированной по *Ser807/811* ретинобластомы (Rb, #9308, Cell Signaling, США); (5) моноклональные мышинные антитела против фосфорилированного по *Ser15* p53 (clone

16G8) (#9286, Cell Signaling, США); (6) поликлональные кроличьи антитела против SET7/SET9 (#2813, Cell Signaling, США).

По окончании инкубации с первичными антителами мембрану промывали 3 раза по 5 минут в TTBS при покачивании, затем помещали в раствор вторичных антител в 5 %-ном растворе обезжиренного молока в TTBS и инкубировали в течение 1 часа, после чего снова промывали мембрану 3 раза по 5 минут в TTBS. В качестве вторичных антител применяли конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов (1) кролика (GAR-HRP) (#7074, Cell Signaling, США) или (2) мыши (GAM-HRP) (#7076, Cell Signaling, США). Белки, связавшиеся с антителами, выявляли детекцией пероксидазной активности конъюгатов GAR-HRP/GAM-HRP с помощью реакции усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Швеция). Для этого мембрану инкубировали в растворе ECL в течение 5 мин, а затем регистрировали хемилюминесцентное излучение экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RPNEW (CEA AB, Швеция).

4. Молекулярное клонирование и сборка лентивирусных частиц для генетической модификации клеток

4.1. Трансформация компетентных бактерий методом теплового шока и накопление плазмиды.

Для накопления плазмиды использовали бактерии *E.coli*, штамм DH5a. Компетентные бактерии выращивали при температуре +37°C на жидкой среде Лурия-Бертани (LB) pH 7.2, содержащей 1% NaCl, 1% пептона, 0.5% дрожжевого экстракта. Для трансформации компетентные бактерии помещали в пробирках в ледяную баню и инкубировали с плазмидой 20 минут при температуре +4°C. По окончании инкубации, компетенты переносили в водяную баню на 90 секунд при температуре +42°C, после чего снова на 15 минут в ледяную баню. Трансформированные бактерии высевали на чашки Петри на агаризованную LB среду, содержащей 2.5% агара и ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, и инкубировались при +37°C. На следующий день с чашек отбирали несколько отдельных колоний бактерий и переносили в пробирки с жидкой LB средой, содержащей ампициллин в концентрации 150 мкг/мл.

4.2. Выделение ДНК.

Колонию, полученную в результате трансформации клеток штамма *E. coli* DH5a, инокулировали в 200 мл жидкой LB-среды, содержащей соответствующий антибиотик, и

культивировали при температуре +37 °С в течение ночи. Бактериальные клетки осаждались центрифугированием. Для выделения ДНК осадок ресуспензировали в растворе (1), содержащем 25 мМ Tris-HCl pH 7.4, 5 мМ EDTA. Затем добавляли двойной объём раствора для лизиса (2), содержащего 0.2 М NaOH, 1% SDS. Лизат перемешивали до образования вязкого раствора. К имеющемуся раствору добавляли полуторный объём раствора (3), содержащего 3М ацетата калия CH_3COOK , 2М уксусной кислоты CH_3COOH . Раствор осторожно перемешивали до исчезновения жёлтой фазы. Пробу центрифугировали 5 минут, 12000 rpm при температуре +4°C. К супернатанту добавляли двойной объём 96% этанола и инкубировали 30 минут при температуре -20°C. После инкубации пробу центрифугировали 5 минут, 12000 rpm при температуре +4°C, удаляли супернатант и сушили осадок до исчезновения запаха этанола. Для дальнейшего использования выделенной ДНК, осадок растворяли в растворе 1, содержащего РНКазу в концентрации 100 мкг/мл, с последующей инкубацией 60 минут при температуре +37°C. Эффективность очистки проб от РНК устанавливали с помощью электрофореза ДНК в агарозном геле. Для удаления фермента последовательно добавляли эквивалентные объёмы растворов 2 и 3 (пункт 5.2.). Центрифугирование, осаждение ДНК в этаноле, высушивание и добавление раствора 1 к осадку проводилось повторно по вышеописанной методике.

4.3. Очистка выделенной ДНК смесью фенол-хлороформ-изобутиловый спирт.

Для очистки ДНК была подготовлена смесь фенол-хлороформ-изобутиловый спирт (ФХИ) в пропорции объёмов 25:24:1 соответственно. К раствору ДНК в тяге добавляли эквивалентный объём смеси ФХИ и центрифугировали 5 минут, 12000 rpm при температуре +10°C. Верхнюю жидкую фракцию, содержащую плазмидную ДНК, отбирали в чистую пробирку и добавляли такой же объём смеси ФХИ. Процедуру повторяли 2 раза со смесью ФХИ и 2 раза с добавлением такого же объёма чистого хлороформа. К полученной водной фракции добавляли двойной объём 96%-ого этанола и 1/10 часть объёма 3М раствора ацетата натрия (CH_3COONa) для осаждения плазмидной ДНК.

4.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле.

Для анализа длин фрагментов и количества ДНК образцы смешивали с коммерческим буфером для нанесения и переносили в лунку в геле. Для осуществления электрофореза использовался 2% агарозный гель с лунками нужного объема. Электрофорез проводился в буфере TAE (40 мМ Tris-Ас pH 7,6, 1 мМ EDTA) в камере для

агарозного электрофореза при напряжении 80 В до проникновения проб в гель, затем 120 В в течение 30 минут. В качестве маркера длин ДНК использовали GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, США). Для идентификации ДНК гели переносили в раствор интеркалирующего красителя - бромистого этидия, и визуально оценивали количество ДНК в каждой пробе на трансиллюминаторе.

4.5. Трансфекция пакующих клеток HEK293T.

Трансфекцию клеток HEK293T и производство лентивирусов проводили с использованием промышленного набора Lenti-X Packaging Single Shots (Takara, Япония). Клетки культивировались в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США), и инкубировались при 37°C в атмосфере 5% CO₂ чашках Петри диаметром 100 мм. Трансфекцию проводили по достижении клетками 80-90% монослоя. За 1 час до трансфекции клетки культивировали в бессывороточной среде. В пробирку из набора Lenti-X Packaging Single Shots (Takara, Япония), содержащую трансфецирующие агенты добавляли заранее приготовленный раствор плазмидной ДНК согласно протоколу (7 мкг в 600 мкл деионизированной воды). Раствор перемешивали на вортексе в течение 20 секунд и инкубировали 10 минут при комнатной температуре для образования комплексов наночастиц. По окончании инкубации раствор добавляли к 8 мл свежеприготовленной среды для культивирования. Бессывороточную среду в культуре клеток заменяли на среду, содержащую трансфецирующие наночастицы, и инкубировали клетки в течение 4 часов при +37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 4 часа добавляли дополнительные 6 мл свежеприготовленной среды с сывороткой и инкубировали при тех же параметрах дополнительные 42 часа. Сбор супернатанта с лентивирусными частицами проводили через 48 часов и через 72 часа после трансфекции, супернатанты объединяли в одну пробу. Наличие лентивирусных частиц в супернатанте определяли с помощью промышленного набора Lenti-X GoStix (Takara, Япония) путём добавления 20 мкл супернатанта на тест-полоску.

4.6. Очистка и концентрирование лентивирусных частиц.

Для очистки и концентрирования вирусов использовался метод ультрацентрифугирования на 20%-ом растворе сахарозы (20% сахарозы, 100 мМ NaCl, 20 мМ HEPES pH 7.4, 1 мМ EDTA). Для этого под слой супернатанта шприцом насаивали 8 мл раствора сахарозы и центрифугировали на ультрацентрифуге 2 часа, 47 000 g при температуре +4°C. После центрифугирования сливали супернатант и ресуспензировали

осадок в холодной ростовой среде без сыворотки. Стоки вирусов хранили при температуре -70°C .

5. Трансдукция клеточной линии эМСК лентивирусными векторами и получение культуры с нокаутом гена *SETD7*

5.1. Используемая конструкция и вектор.

В ходе работы на основе линий эМСК 2804 с помощью CRISPR/Cas-системы геномного редактирования была получена клеточная линии с нокаутом *Set7/9* путем трансфекции вектором lentiCRISPR v2.0-Set7/9KO.

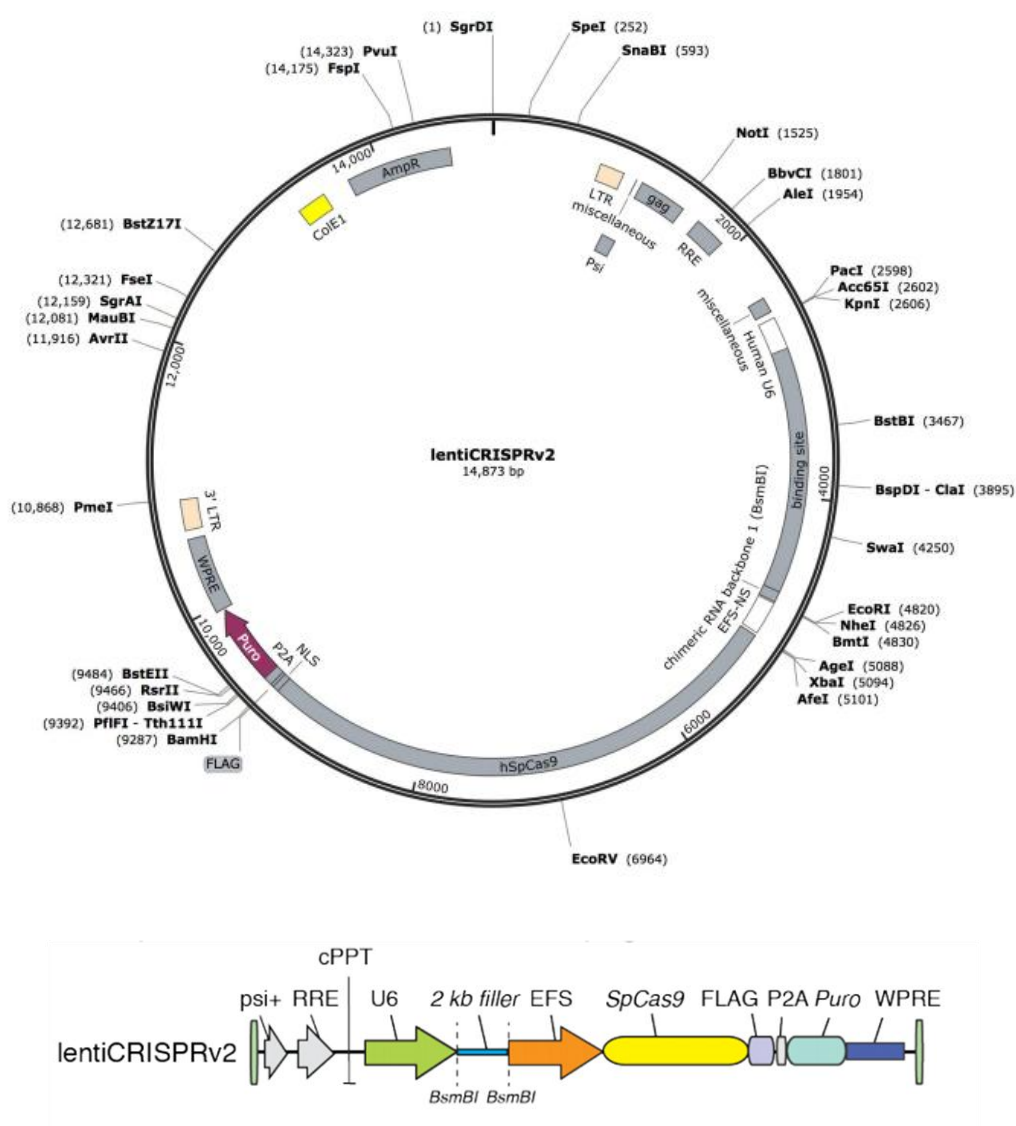


Рис. 5. Карта вектора лентивирусной экспрессии для Cas9 и sgRNA (lentiCRISPR) (по Shalem, Sanjana, et al., Science 2014). Puro, маркер селекции пурамицина; psi +, ретровирусный Пси упаковочный сигнал; RRE, элемент отклика rev (Rev Response element); cPPT, центральный полипуринный тракт; EFS, фактор элонгации-1α, короткий

(рис.4 ,продолжение описания) промотор; P2A, саморасщепляющийся пептид 2A; WPRE, посттранскрипционный регуляторный элемент; FLAG, FLAG-метка.

Вектор lentiCRISPR v2.0-Set7/9KO кодирует гидовую РНК (gRNA) для специфического нокаутирования гена *SETD7*:

Setd7KO_fwd: 5'CACCGTAGCGACGACGAGATGGTGG

Setd7KO_rev: 5'AAACCCACCATCTCGTCGTCGCTAC

Данный вектор был любезно предоставлен Барлевым Н.А. (лаборатория регуляции экспрессии генов, Институт Цитологии РАН).

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) представляет собой микробную нуклеазную систему, участвующую в защите бактериальных клеток от вторжения фагов и плазмид. Локусы CRISPR в клетках-хозяевах содержат комбинацию связанных с CRISPR генов (CRISPR associated gene, Cas), а также некодирующих РНК, способных программировать CRISPR-опосредованное расщепление ДНК. Lentивирусный вектор с CRISPR/Cas может инфицировать широкий спектр клеток млекопитающих путем совместной экспрессии кодон-оптимизированной нуклеазы Cas9 млекопитающих вместе с gRNA для облегчения редактирования генома (Shalem, Sanjana, et al., Science 2014).

lentiCRISPRv2 плаزمида содержит две экспрессирующиеся кассеты, hSpCas9 и gRNA. Вектор несёт маркер селекции пурамицина, что позволяет производить селекцию трансфицированных клеток с помощью соответствующего антибиотика. Вектор разрезается с помощью рестриктазы BsmBI, и пара олигонуклеотидов может быть клонирована в один каркас с gRNA (рис. 5). Данная gRNA комплементарна 638-657 нуклеотидам кодирующей последовательности гена, соответствующей первому экзону.

5.2. Трансдукция клеточной линии 2804 и последующая селекция.

Для трансдукции клеток эмМК линии 2804 в среду для культивирования добавляли вспомогательный агент – полибрен в концентрации 4 мкг/мл и лентивирусные частицы, содержащие плазмидную ДНК, из расчёта значения множественности инфекции $MOI = 5$. Клетки инкубировались 18 часов при +37°C в атмосфере 5% CO₂ с последующей заменой среды без промывок, после чего инкубировались ещё 30 часов. Селекция клеток производилась 2 суток с использованием антибиотика пурамицина в концентрации 1 мкг/мл.

6. Метод проточной цитофлуориметрии

6.1. Анализ изменения размера и количества клеток

Прикрепленные клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и Версена (0.05 %), осаждали центрифугированием и промывали раствором PBS. Далее образцы анализировали на цитофлуориметре EPICS XL или CytoFlex (BackmanCoulter, США). Размер клеток оценивали по изменению прямого светорассеяния (FS). Число клеток определяли по количеству событий. Данные собирали и обрабатывали с помощью программы WinMDI (версия 2.8) или CytExpert (версия 1.2).

6.2. Анализ апоптотических клеток, окрашенных с помощью йодида пропидия и Annexin V/FITC

Для анализа H₂O₂-индуцированного апоптоза клетки окрашивали йодидом пропидия (PI) и Annexin V/FITC (An V) следующим образом. Клетки дважды промывали холодным PBS, ресуспендировали в 1-кратном связывающем буфере, приготовленном из 10-кратного исходного раствора, содержащего 0,1 М HEPES/NaOH (pH 7,4); 1,4 М NaCl; 25 мМ CaCl₂, и инкубировали с 5 мкл Annexin V (An V), меченого FITC (BD Biosciences, США), и 5 мкл PI в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Непосредственно перед анализом добавляли к каждому образцу по 400 мкл 1-кратного связывающего буфера.

В процессе апоптоза клетки экспонируют фосфатидилсерин на клеточной поверхности. An V является кальций-зависимым фосфолипид-связывающим протеином, селективно и с высокой аффинностью связывает фосфатидилсерин, при этом он проявляет очень низкую аффинность к таким фосфолипидам, как фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин и фосфатидилхолин. Такой профиль связывания позволяет использовать An V в качестве высокоспецифичного агента для определения апоптотических клеток (Koorman et al., 1994; Vermes et al., 1995; van Engeland et al., 1996). PI, в свою очередь, интеркалирует в ДНК мертвых клеток. Благодаря этим свойствам, совместное окрашивание An V и PI позволяет разделять ранне (An V+/PI-) -, поздние (An V+/PI+) апоптотические и некротические (An V-/PI+) клетки. Анализ окрашенных клеток проводили на цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Backman Coulter).

7. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel (Microsoft, США) и STATISTICA 13.3 (StatSoft, США). Данные представлены в виде средних значений со среднеквадратическими отклонениями $\pm SD$ (N=3), * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, p -уровень значимости определялся с помощью парного t -теста Стьюдента для независимых выборок. Принятый уровень статистической значимости $\alpha=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что в ответ на сублетальный окислительный стресс в ЭМСК происходит индукция преждевременного старения (Бурова и др., 2012; Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2014). Так, было показано, что обработка клеток 200 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч практически не влияет на жизнеспособность ЭМСК (Бурова и др., 2012), однако приводит к необратимому блоку клеточного цикла на переходе G1/S, потере пролиферации и развитию клеточного старения (Burova et al., 2013). Было выявлено, что H_2O_2 -обработанные ЭМСК приобретают характерные для стареющих клеток фенотипические признаки: клетки увеличиваются в размере и уплощаются, а также демонстрируют повышение активности SA- β -Gal и уровня внутриклеточных АФК. При дальнейшем исследовании молекулярных механизмов старения ЭМСК было установлено, что обработка клеток H_2O_2 приводит к возникновению двойных разрывов ДНК и последующей активации основных участников ответа на повреждение ДНК, включая киназу ATM, гистон H2AX, и адаптерный белок 53BP1 (Borodkina et al., 2014). Результатом последующей передачи сигнала через ATM/p53/p21/Rb сигнальный путь является блок клеточного цикла. Кроме того, было обнаружено, что процесс стабилизации клеточного старения и, как следствие, необратимая потеря пролиферации стареющими ЭМСК, опосредуется перманентной активностью DDR, повышением уровня внутриклеточных АФК и усилением митохондриальной активности. Повышение концентрации H_2O_2 в свою очередь приводит к активации процесса программируемой клеточной смерти – апоптоза. Оба типа ответа на окислительный стресс регулируются белком p53. Метилирование 373 лизина в регуляторном домене белка p53 является необходимым условием для его активации. В качестве одного из основных ферментов, осуществляющего метилирование выдвигается лизиновая метилтрансфераза гистонов Set7/9, для которой показана возможность метилирования ряда негистоновых белков.

1. Экспрессия Set7/9 в мезенхимных стволовых клетках линии ЭМСК в условиях окислительного стресса.

На первом этапе исследования была проведена оценка экспрессии метилтрансферазы Set7/9 в клетках ЭМСК в условиях моделирования окислительного стресса при инкубировании клеток в ростовой культуре с добавлением сублетальной дозы H_2O_2 (200 мкМ) (см. Материалы и методы 3.3). В качестве контроля использовались необработанные клетки, инкубируемые на полной ростовой среде. Оценивали содержание Set7/9 в лизатах ЭМСК на сроках 0 (контроль), 30, 60, 90 минут и 6, 24 часа после

стимулирования клеток. Наличие активации процесса старения оценивали с помощью иммуноблотинга с антителами к фосфорилированной форме белка p53 (рис. 6).

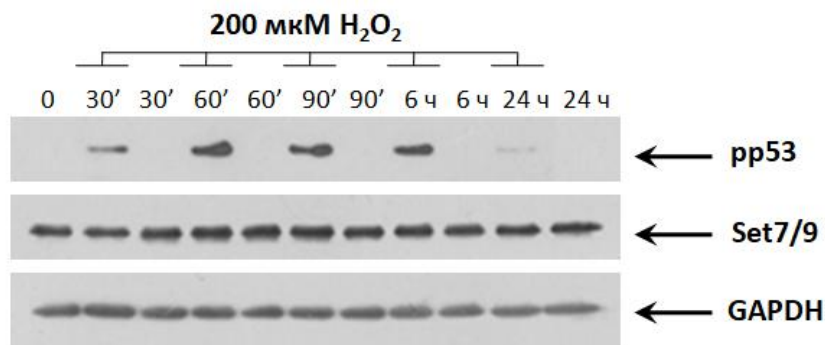


Рис. 6. Выявление метилтрансферазы Set7/9 в лизатах эМСК после действия 200 мкМ H₂O₂. Иммуноблотинг проводили с использованием антител против фосфорилированной формы белка p53 (pp53) и Set7/9. В качестве контроля равномерности нанесения белка использовался GAPDH.

На основании полученных данных можно заключить, что при действии сублетальной дозы H₂O₂ эМСК подвергались клеточному старению, что видно по увеличению уровня экспрессии pp53 в первые 6 часов после стимулирования клеток. Однако положительной или отрицательной динамики Set7/9 не было выявлено. На протяжении всего периода в течение 24 часов наблюдается устойчивая экспрессия Set7/9 в обработанных эМСК, не отличающаяся от контроля.

2. Нокаут гена *setd7*, кодирующего метилтрансферазу Set7/9 в клетках эМСК.

В ходе работы на основе линий эМСК с помощью CRISPR/Cas-системы геномного редактирования была получена клеточная линия с нокаутом Set7/9 путем трансфекции вектором lentiCRISPR v2.0-Set7/9KO (рис. 5). Вектор lentiCRISPR v2.0-Set7/9KO кодирует гидовую РНК (gRNA) для специфического нокаутирования гена *SETD7*:

Setd7KO_fwd: 5'CACCGTAGCGACGACGAGATGGTGG

Setd7KO_rev: 5'AAACCCACCATCTCGTCGTCGCTAC

lentiCRISPRv2 плаزمида содержит две экспрессирующиеся кассеты, hSpCas9 и gRNA. Вектор разрезается с помощью рестриктазы BsmBI, и пара олигонуклеотидов может быть клонирована в один каркас с gRNA (рис. 5). Данная gRNA комплементарна

638-657 нуклеотидам кодирующей последовательности, соответствующей первому экзону гена *setd7*.

Для трансдукции эМСК клетки культивировались совместно с лентивирусными частицами и вспомогательным агентом – полибренном с последующей селекцией клеток с использованием антибиотика пурамицина (см. Материалы и методы 5.2). Так как эМСК являются высокочувствительными клетками в отношении высоких доз пурамицина, полная селекция клеток с делецией невозможна.

Для выявления нокаута была детектирована метилтрансфераза Set7/9 в лизатах эМСК, обработанных лентивирусными частицами, несущими конструкцию lentiCRISPRv2.0-Set7/9KO. Для детектирования использовался метод иммуноблотинга (рис. 7).

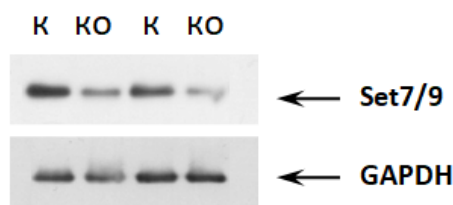


Рис. 7. Выявление метилтрансферазы Set7/9 в лизатах эМСК с нокаутом гена *setd7*. Иммуноблотинг проводили с использованием антител против Set7/9. В качестве контроля равномерности нанесения белка использовался GAPDH. К – контроль (эМСК), КО – нокаут по гену *setd7* в эМСК.

На основании полученных данных можно заключить, что уровень экспрессии Set7/9 в обработанных клетках (КО) значительно снижается по сравнению с контролем (К) – необработанными эМСК. Культура эМСК в данном случае смешанная. эМСК являются первичной, неиммortalной культурой клеток человека, чувствительная к обработке антибиотиком. В связи с этим невозможно клонирование культуры и получение чистой линии с нокаутом гена *setd7*. Однако полученное снижение общего уровня экспрессии белка Set7/9 в культуре эМСК является достаточным для изучения влияния метилтрансферазы на исследуемые процессы клеточного ответа на окислительный стресс. В дальнейших экспериментах использовалась смешанная культура эМСК с пониженным уровнем Set7/9.

3. Сравнение кривых роста клеток эМСК и мутантных эМСК с нокаутом.

Для установления пролиферативного статуса обработанных 200 мкМ H₂O₂ эМСК со сниженным уровнем метилтрансферазы Set7/9 использовался метод проточной

цитометрии с определением числа живых клеток по количеству событий (см. Материалы и методы 6.1). Оценивали число событий на сроках 0 (контроль), 5 и 7 дней. Данные представлены на графиках кривых роста по абсолютному числу событий (**рис. 8**) и кривых роста в процентном выражении (**рис. 9**).

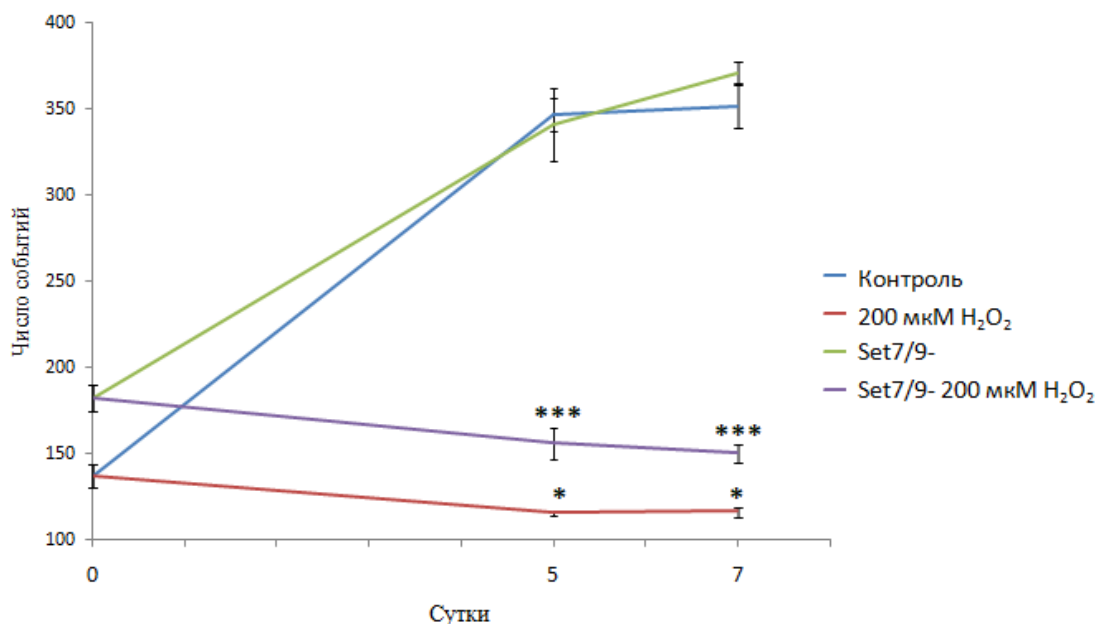


Рис. 8. Кривые роста контрольных и обработанных 200 мкМ H₂O₂ (эМСК) и клеток со сниженным уровнем метилтрансферазы Set7/9. Контроль – необработанные эМСК; 200 мкМ H₂O₂ – эМСК, подверженные обработке сублетальной дозой H₂O₂; Set7/9- – необработанные эМСК с нокаутом; Set7/9- 200 мкМ H₂O₂ – эМСКс нокаутом, подверженные обработке сублетальной дозой H₂O₂. Данные представлены в виде средних значений \pm SD (N=3), * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Как видно из данных, представленных на рисунке 6, и контрольные эМСК и эМСК со сниженным уровнем Set7/9 после обработки 200 мкМ H₂O₂ теряют способность к пролиферации. Об этом свидетельствует отсутствие увеличения числа H₂O₂-стимулированных клеток в течение как минимум 7 суток по сравнению с контрольными пролиферирующими клетками (**рис. 8**).

На основании данных по графикам кривых роста в процентном выражении (**рис. 9**) можно сделать вывод о схожести пролиферативного статуса контрольных эМСК и эМСК со сниженным уровнем Set7/9. В данном случае метилтрансфераза не влияет на характер ответа клеток на окислительный стресс. Статистически значимых различий между выборками выявлено не было.

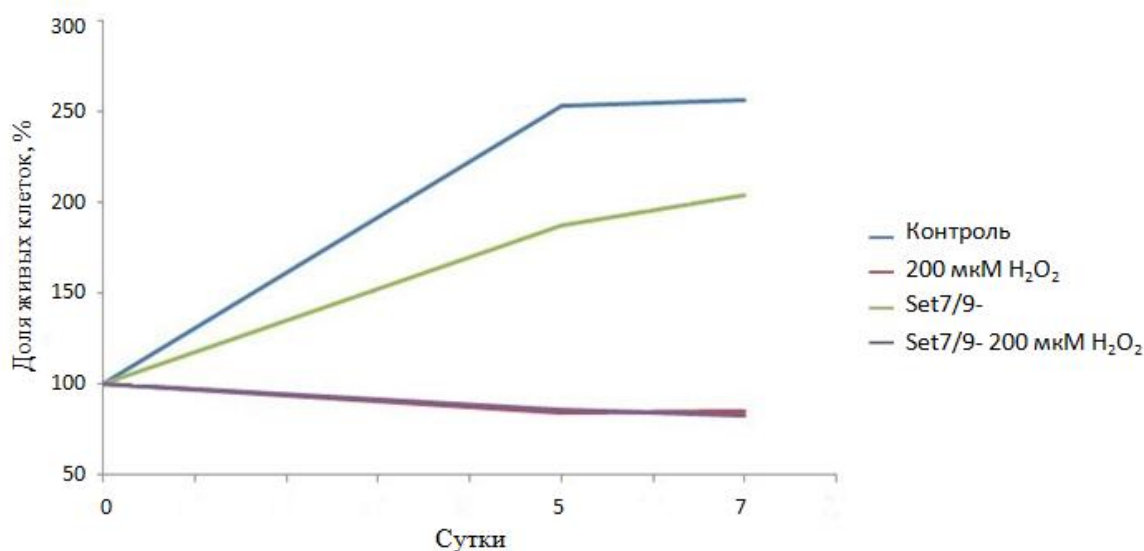


Рис. 9. Кривые роста контрольных и обработанных 200 мкМ H₂O₂ (эМСК) и клеток со сниженным уровнем метилтрансферазы Set7/9, представленные в процентном выражении. Контроль – необработанные эМСК; 200 мкМ H₂O₂ – эМСК, подверженные обработке сублетальной дозой H₂O₂; Set7/9- – необработанные эМСК с нокаутом; Set7/9- 200 мкМ H₂O₂ – эМСКс нокаутом, подверженные обработке сублетальной дозой H₂O₂.

Представленные результаты подтверждают, что сублетальная доза H₂O₂ действительно инициирует преждевременное старение в клетках эМСК со сниженным уровнем метилтрансферазы Set7/9. Характер пролиферативного статуса при этом схож с таковым у стимулированных эМСК с нормальной экспрессией Set7/9.

4. Активация p53/p21 и p16/pRb сигнальных путей клеточного старения в мутантных клетках эМСК со сниженным уровнем метилтрансферазы Set7/9.

Механизм возникновения ареста клеточного цикла включает подавление активности циклин-зависимых киназ, регулирующих прохождение клеток по фазам цикла, в результате связывания ингибиторов циклин-зависимых киназ (CDKI) с ферментом. Ранее было показано, что наиболее важную роль в индукции блока клеточного цикла при развитии преждевременного старения клеток человека, в том числе и эМСК, играет такой ингибитор циклин-зависимых киназ, как белок p21. В связи с этим представляло интерес исследовать возможное участие данного ингибитора в процессе H₂O₂-индуцированного старения эМСК со сниженным уровнем Set7/9. Оказалось, что стимулирование клеток H₂O₂ в концентрации 200 мкМ приводит к выявлению p53 и p21 уже через 3 часа после обработки (**рис. 10**). Причём, кинетика активации p53 и p21 схожа как в эМСК, так и

эмСК с недостатком Set7/9: резкое увеличение уровня экспрессии после обработки и постепенное снижение к 7 часам после обработки.

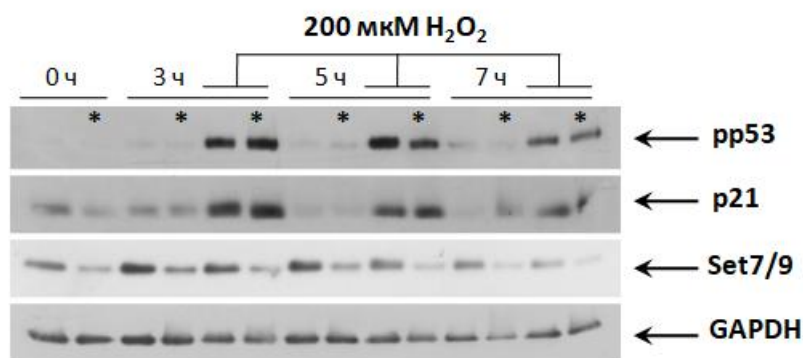


Рис. 10. Кинетика активации сигнального пути p53/p21 в H₂O₂-стимулированных эмСК и эмСК со сниженным уровнем Set7/9. * - эмСК со сниженным уровнем Set7/9. В качестве контроля нанесения белка использовался GAPDH.

Известно, что индукция экспрессии p16 и p21 препятствует фосфорилированию белка Rb и, следовательно, запуску E2F-зависимой транскрипции генов пролиферации, останавливая при этом репликацию ДНК и деление клетки. Для оценки функционального состояния Rb в процессе установления блока клеточного цикла в эмСК контрольных и с недостатком Set7/9, была исследована кинетика активации этого белка в H₂O₂-стимулированных клетках. Как и ожидалось, фосфорилированная форма Rb (pRb) в обработанных клетках отсутствовала, начиная с 3 ч после действия H₂O₂ и далее в течение всего периода наблюдения, тогда как для контрольных клеток был характерен высокий уровень фосфорилирования Rb (рис. 11).

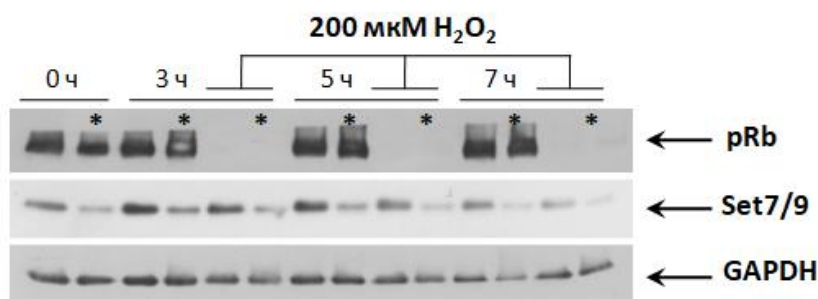


Рис. 11. Кинетика активации белка Rb в H₂O₂-стимулированных эмСК и эмСК со сниженным уровнем Set7/9. * - эмСК со сниженным уровнем Set7/9. В качестве контроля нанесения белка использовался GAPDH.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что активация p53/21 и p16/pRb путей, приводящих к аресту клеточного цикла и индукции преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса не зависят от уровня экспрессии метилтрансферазы Set7/9.

5. Характер ответа на активацию апоптоза в клетках эМСК со сниженным уровнем метилтрансферазы Set7/9.

После оценки характера ответа исследуемых клеточных линий на окислительный стресс представлялось интересным сравнить особенности гибели данных клеток при действии летальной концентрации H_2O_2 . Известно, что окислительный стресс при определенных условиях индуцирует в различных типах клеток запрограммированную клеточную гибель – апоптоз.

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что инкубирование эМСК в ростовой среде с добавлением H_2O_2 в концентрации 900 мкМ в течение часа инициирует гибель данной линии клеток апоптозом.

Одним из методов детекции апоптоза является двойное флуоресцентное окрашивание клеток иодидом пропидия (PI) и аннексином V (An V), конъюгированным с FITC. В основе этого метода лежит способность An V специфично и с высокой аффинностью связывать фосфатидилсерин, презентируемый на внешней листке клеточной мембраны апоптотических клеток. Одновременное окрашивание An V/FITC и PI с последующим анализом методом проточной цитометрии позволяет разделить следующие фенотипы клеток: живые (An V-/PI-), ранне-апоптотические (An V+/PI-), поздне-апоптотические (An V+/PI+) и некротические клетки (AnV-/PI+).

Подсчёт процента клеток определённого фенотипа проводили на проточном цитометре на сроках 0 (контроль), 6 и 24 часа после стимулирования клеток. Результаты распределения клеток по фенотипам на данных сроках представлены на **рис. 12**. Из данных диаграмм видно, что, как и ожидалось, к 24 часам после стимулирования клеток высокой дозой H_2O_2 количество событий в зоне с «поздне-апоптотическим» фенотипом (An V+/PI+) значительно вырастает, а в зоне «живые» (An V-/PI-) доля клеток снижается. При этом оказалось, что доля эМСК со сниженным уровнем Set7/9 с фенотипом An V+/PI+ выше, чем эМСК без мутации на сроке 24 часа.

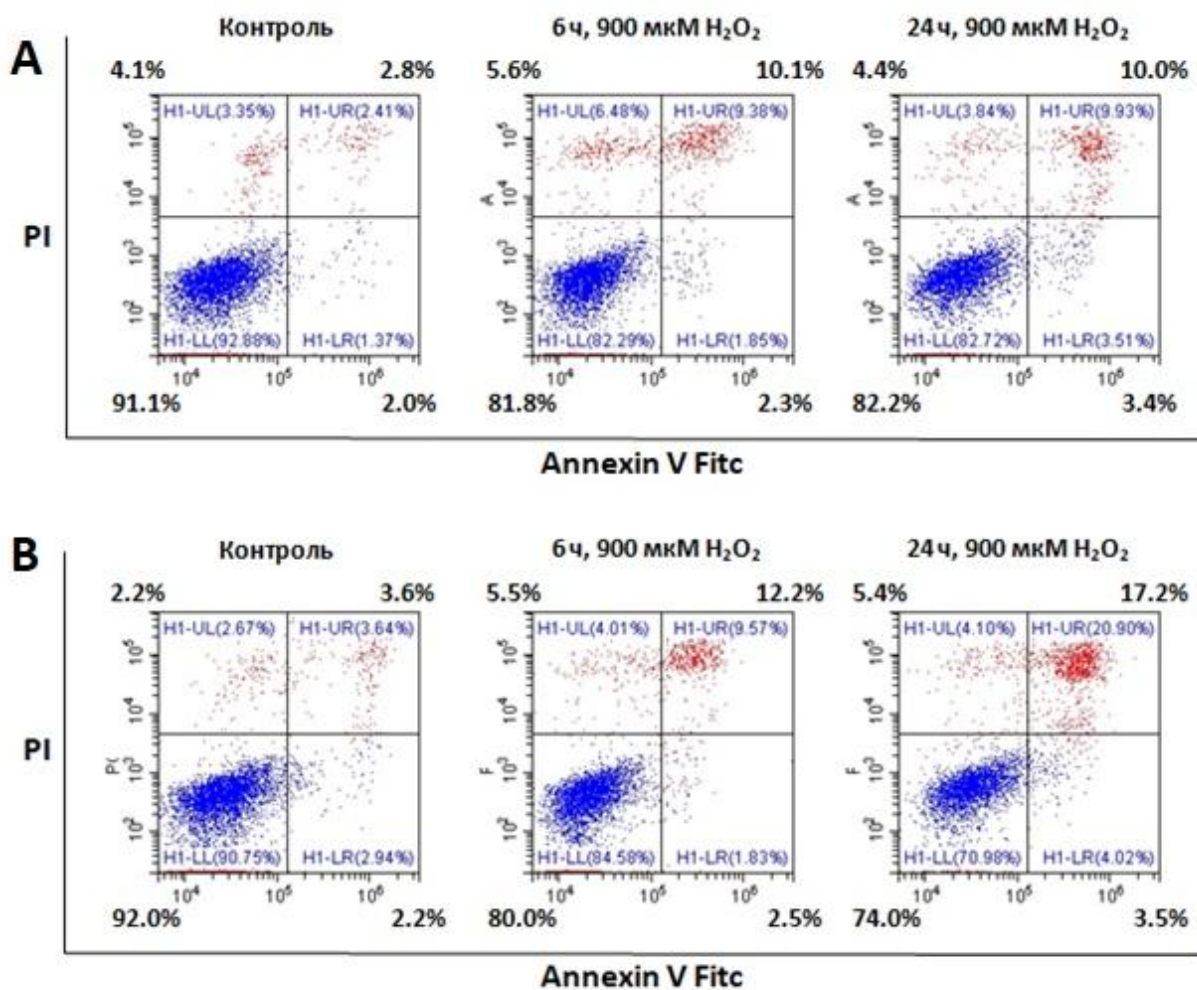


Рис. 12. А. Распределение эМСК, меченных An V/FITC и PI, после действия H₂O₂ в концентрации 900 мкМ.

В. Распределение эМСК со сниженным уровнем Set7/9, меченных An V/FITC и PI, после действия H₂O₂ в концентрации 900 мкМ.

Для наглядности представлены гистограммы динамики клеток по фенотипам живые (An V-/PI-), ранне-апоптотические (An V+/PI-), поздне-апоптотические (An V+/PI+) и некротические клетки (AnV-/PI+) (**рис. 11**). Данные представлены в виде средних значений \pm SD (N=3), * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем. Очевидно, что доля живых клеток с течением времени после стимулирования клеток высокой дозой H₂O₂ снижается (**рис.13А**). Причём доля живых эМСК со сниженным уровнем экспрессии Set7/9 меньше на 10% по сравнению с контролем данной временной точки (эМСК без мутации по Set7/9). В то же время доля An V+/PI+ мутантных эМСК со сниженным уровнем Set7/9 на 70% больше An V+/PI+ эМСК с нормальной экспрессией Set7/9.

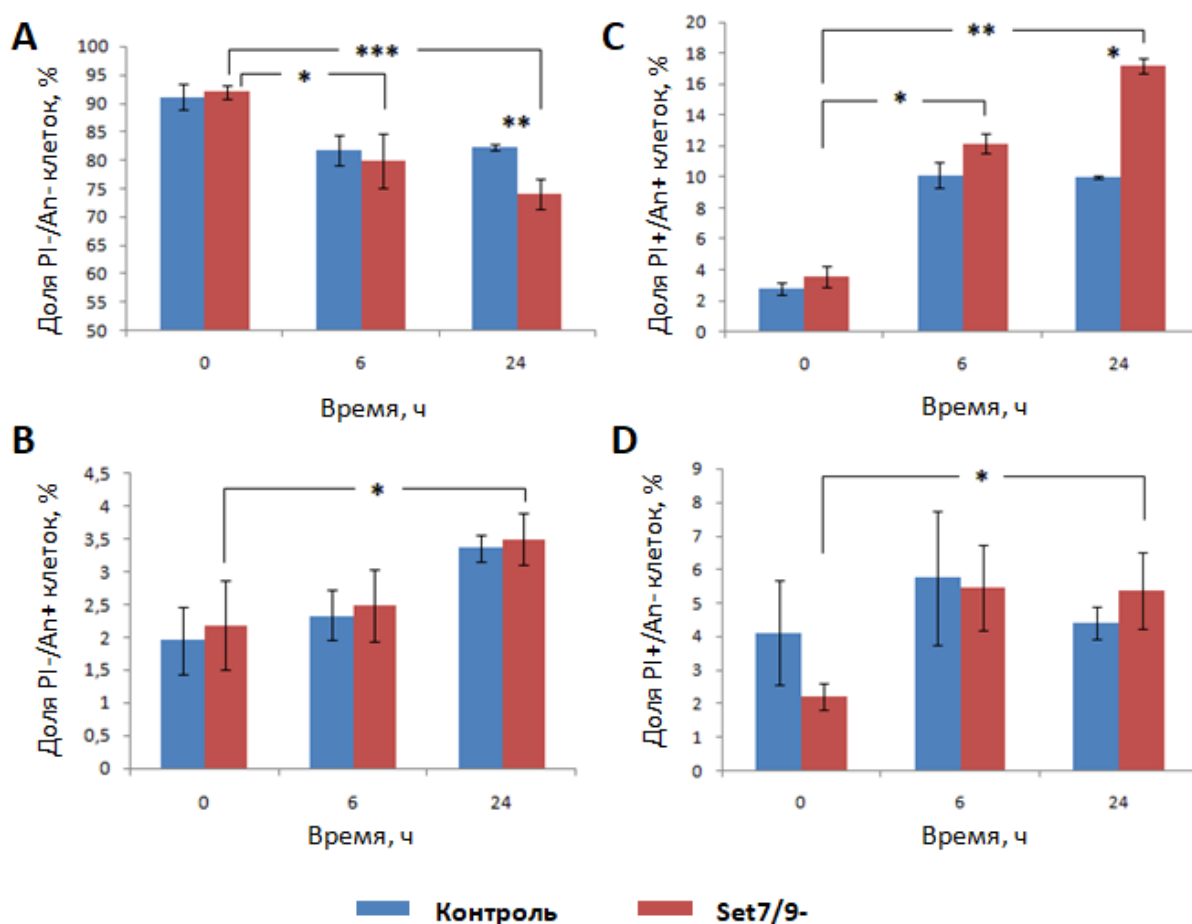


Рис. 13. Динамика распределения эМСК и эМСК со сниженным уровнем Set7/9 по фенотипам. А. Живые (An V-/PI-). **Б.** Ранне-апоптотические (An V+/PI-). **В.** Поздне-апоптотические (An V+/PI+). **Г.** Некротические клетки (AnV-/PI+). Контроль – эМСК; Set7/9- – эМСК со сниженным уровнем Set7/9. Данные представлены в виде средних значений \pm SD (N=3), * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Согласно литературным данным, гистоновая лизина метилтрансфераза Set7/9 участвует в метилировании p53 в раковых клетках (Chuikov et al. 2004; Huang et al. 2006; Pradhan et al. 2009). В исследовании Chuikov et al. 2004 года было показано, что Set7/9 метилирует p53, а гиперэкспрессия Set7/9 при генотоксическом стрессе приводит к высокому уровню белка p21. Также было показано, что метилированная форма p53 находится в ядре (Chuikov et al. 2004). Исследования Ivanov et al. и Kurash et al. о необходимости предварительного метилирования для последующего ацетилирования и активации p53 было проведено именно на основе данных исследования Chuikov et al. 2004 с использованием раковых культур и линии мышей с нокаутом и нокдауном гена, кодирующего метилтрансферазу Set7/9, соответственно. Интересно, что для Set7/9 была показана способность регулировать активность фактора E2F1, связанного с активностью белка p53, а также регулировать p53 через MDM-2. Данное исследование было проведено

в том числе на раковых клетках (Lezina et al. 2014; Lezina et al. 2015). В связи с этим интерес представляло исследование роли данной метилтрансферазы в культуре здоровых стволовых клеток эндометрия матки человека, способного отвечать на окислительный стресс активацией клеточного старения или апоптоза в зависимости от величины стимула.

На основе всех вышеизложенных результатов можно заключить, что в эМСК наблюдается устойчивая экспрессия метилтрансферазы Set7/9 при активации клеточного старения. Причём эМСК с недостатком метилтрансферазы Set7/9 реагируют на сублетальные дозы H_2O_2 арестом клеточного цикла и остановкой пролиферативной активности как и эМСК без мутации. В связи с данными событиями в клетке происходит активация классических сигнальных путей старения: p53/p21 и p16/pRb. Причём недостаток метилтрансферазы Set7/9 не влияет на изменение характера ответа на сублетальную дозу H_2O_2 по сравнению с контролем. Данное явление может быть связано с наличием компенсаторных механизмов, регулирующих посттрансляционную модификацию белка p53 как основного регулятора клеточного цикла и эффектора при клеточном ответе на повреждение ДНК.

Однако интерес представляет характер ответа эМСК с недостатком белка Set7/9 на поздних стадиях активации апоптоза через 24 часа после стимулирования клеток летальной дозой H_2O_2 . Отмечается значительное увеличение AnV+/PI+ клеток по сравнению с контролем данной временной точки, причём на более ранней стадии (6 ч) существенных различий не наблюдается. что говорит о снижении порога устойчивости мутантных клеток к летальным дозам H_2O_2 с течением времени.

ВЫВОДЫ

1. По мере развития H_2O_2 -индуцированного стресса в культуре эмСК наблюдается устойчивая экспрессия гена метилтрансферазы Set7/9.
2. При нокаутировании гена *setd7* в культуре наблюдается снижение продукта экспрессии гена, однако получение чистой линии эмСК с нокаутом гена *setd7* не представляется возможным.
3. Метилтрансфераза Set7/9 не оказывает влияния на активацию процесса клеточного старения через сигнальные пути p53/p21 и p16/pRb в условиях сублетальной дозы H_2O_2 (200 мкМ).
4. Метилтрансфераза Set7/9 не оказывает влияния на процесс активации и развития апоптоза в условиях летальных доз H_2O_2 на ранних сроках.
5. Недостаток метилтрансферазы Set7/9 оказывает негативное влияние на выживаемость клеток на поздних стадиях развития апоптоза в условиях летальных доз H_2O_2 .

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурова, Е. Б., 2012 Сравнительный анализ устойчивости к окислительному стрессу стволовых клеток эндометрия и фибробластов человека / Е. Б. Бурова, О. Г. Люблинская, А. Н. Шатрова, А. В. Бородкина, Н. Н. Никольский // *Цитология*. – № 6. – Р. 478 – 483.
2. Земелько, В. И., 2011 Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека / В. И. Земелько, Т. М. Гринчук, А. П. Домнина, И. В. Арцыбашева, В. В. Зенин, А. А. Кирсанов, Н. К. Бичева, В. С. Корсак, Н. Н. Никольский // *Цитология*. – 2011. – № 12. – Р. 919 – 929.
3. Ak, P. & Levine, A.J., 2010. p53 and NF- B: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *The FASEB Journal*, 24(10), pp.3643–3652. Available at: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.10-160549>.
4. Alekseenko, L. L. 2014 Sublethal heat shock induces premature senescence rather than apoptosis in human mesenchymal stem cells / L. L. Alekseenko, V. I. Zemelko, A. P. Domnina, O. G. Lyublinskaya, V. V. Zenin, N. A. Pugovkina I. V. Kozhukharova, A. V. Borodkina, T.M. Grinchuk, I. I. Fridlyanskaya и др. // *Cell Stress Chaperones*. – 2014. – № 19. – Р. 355 – 366.
5. Ashkenazi, A., 2008. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery*.
6. Banfi A., Bianchi G., Notaro R., Luzzatto L., Cancedda R., Quarto R. 2002. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*. 8 : 901—910.
7. Baxter M.A., Wynn R.F., Jowitt S.N., Wraith J.E., Fairbairn L.J., Bellantuono I. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 22 : 675–682. Borodkina, A., 2014 Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells / A. Borodkina, A. Shatrova, P. Abushik, N. Nikolsky, E. Burova // *Aging (Albany NY)*. – № 6. – Р. 481 – 495.

8. Borodkina, A. V. et al., 2018. “Social Life” of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It? *Acta Naturae*, 10, pp.4–14.
9. Burova, E., 2013 Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium / E. Burova, A. Borodkina, A. Shatrova, N. Nikolsky // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – № 2013. – 474931.
10. Bowen I.D., Bowen S.M. 1990. Mechanisms of programmed cell death. *Programmed Cell Death in Tumors and Tissues*. Chapman and Hall, London, UK. p. 57–61.
11. Brandl A., Meyer M., Bechmann V., Nerlich M., Angele P. 2011b. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 317 : 1541—547.
12. Campaner, S. et al., 2011. The Methyltransferase Set7/9 (Setd7) Is Dispensable for the p53-Mediated DNA Damage Response In Vivo. *Molecular Cell*, 43, pp.681–688.
13. Campisi, J., 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in cell biology*, 11(11), pp.S27-31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684439> [Accessed December 13, 2017].
14. Campisi, J. & d’Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), pp.729–40. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm2233> [Accessed December 13, 2017].
15. Cervelló I., Mas A., Gil-Sanchis C., Simón C. 2013. Somatic stem cells in the human endometrium. *Semin Reprod Med*. 31 : 69–76.
16. Chen, Q. M., Liu, J. & Merrett, J. B. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts. *Biochem. J*. 347, 543–551 (2000).
17. Chipuk, J.E. et al., 2010. The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*, 37(3), pp.299–310. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.025>.
18. Cho N.H., Park Y.K., Kim Y.T., Yang H., Kim S.K. 2004. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril*. 81 : 403–407.
19. Chuikov, S. et al., 2004. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*, 432, pp.353–360.

20. *Cmielova, J.* Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments / J. Cmielova, R. Havelek, T. Soukup, A. Jiroutová, B. Visek, J. Suchánek, J. Vavrova, J. Mokry, D. Muthna и др. // *International Journal of Radiation Biology*. – 2012. – № 5. – P. 393 – 404.
21. *Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., Phinney D.G., Class R., Prockop D.J.* 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colonyforming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 107 : 275—281.
22. *Elmore, S.*, 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp.495–516.
23. *Gargett C.E.* 2007. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update.* 13 : 87–101.
24. *Hayflick, L.*, 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*.
25. *Hayflick, L. & Moorhead, P.S.*, 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), pp.585–621.
26. *Hayflick L.* 1965. "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains". *Exp. Cell Res.* 37 (3): 614–636. Huang, J. et al., 2006. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*, 444(7119), pp.629–632.
27. *Ivanov, G.S. et al.*, 2007. Methylation-Acetylation Interplay Activates p53 in Response to DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, pp.6756–6769.
28. *Jabbour H.N., Kelly R.W., Fraser H.M., Critchley H.O.* 2006. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev.* 27 : 17–46.
29. *Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Curriet, A.R.*, 1972. Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, p.239.
30. *Kim, M.* Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects / M. Kim, C. Kim, Y. S. Choi, C. Park, Y.Suh // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2012. – № 133. – P. 215 –225.

31. *Ko E.* Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress / E. Ko, K. Y. Lee, D. S. Hwang // *Stem Cells and Development*. – 2012. – № 21. – P. 1877 – 1886.
32. *Kurash, J.K.* et al., 2008. Methylation of p53 by Set7/9 Mediates p53 Acetylation and Activity In Vivo. *Molecular Cell*, 29, pp.392–400.
33. *Larsen S.A., Kassem M., Rattan S.I.* 2012. Glucose metabolite glyoxal induces senescence in telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Chem Cent J*. 6 : 18.
34. *Lehnertz, B.* et al., 2011. P53-Dependent Transcription and Tumor Suppression Are Not Affected in Set7/9-Deficient Mice. *Molecular Cell*, 43, pp.673–680.
35. *Lezina, L.* et al., 2015. KMT Set7 / 9 affects genotoxic stress response via the Mdm2 axis. *Oncotarget*, 6(28).
36. *Lezina, L.* et al., 2014. KMTase Set7/9 is a critical regulator of E2F1 activity upon genotoxic stress. *Cell Death and Differentiation*, 21(10), pp.1889–1899.
37. *Meng, X.* Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population / X. Meng, T. E. Ichim, J. Zhong, A. Rogers, Z. Yin, J. Jackson, H. Wang, W. Ge, V. Bogin, K. W. Chan, B. Thébaud, N. H. Riordan // *Journal of Translational Medicine*. – 2007. – № 5. – P. 57.
38. *Padykula H.A.* 1991. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. *Ann NY Acad Sci*. 622 : 47–56.
39. *Patel, A. N.* Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation / A. N. Patel, E. Park, M. Kuzman, F. Benetti, F.J. Silva, J. G. Allickson // *Cell Transplantation*. – 2008. – № 17. – P. 303 – 311.
40. *Pradhan, S.* et al., 2009. SET7/9 mediated methylation of non-histone proteins in mammalian cells. *Epigenetics*, pp.383–387.
41. *Razvi E.S., Welsh R.M.* 1995. Apoptosis in viral infections. *Adv Virus Res*. 49 : 1–60.
42. *Reed, S.M. & Quelle, D.E.*, 2014. P53 acetylation: Regulation and consequences. *Cancers*, 7(30–69), pp.30–69.
43. *Ryan, K.M., Phillips, A.C. & Vousden, K.H.*, 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, pp.332–33.

44. *Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M.* 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 33 : 919—926.
45. *Tepper, C. G., Seldin, M. F. & Mudryj, M.* Fas-mediated apoptosis of proliferating, transiently growth-arrested, and senescent normal human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 260, 9–19 (2000)
46. *Tomei L.D., Cope F.O.* 1994. Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
47. *Umezawa A., Makino H.* 2008. Cell source for regenerative medicine. *Nihon Rinsho*. 66 : 865–872.
48. *Wang D., Jang D.J.* 2009. Protein kinase CK2 regulates cytoskeletal reorganization during ionizing radiation-induced senescence of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 69 : 8200—8207.
49. *Zimmermann S., Voss M., Kaiser S., Kapp U., Waller C.F., Martens U.M.* 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*. 17 : 1146–1149.